

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

DERWENT-ACC- 1992-189665

NO:

DERWENT- 200025

WEEK:

COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Appts. for incubating cells to form interferon - comprises filter with porous plates, hollow support shaft, and closed vessel contg. filter and shaft

PATENT-ASSIGNEE: HITACHI PLANT ENG & CONSTR CO[HIEJ], TOTO LTD[TTOC]

PRIORITY-DATA: 1990JP-0246638 (September 17, 1990)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
--------	----------	----------	-------	----------

JP 04126068 A	April 27, 1992	N/A	007	C12M 003/00
---------------	----------------	-----	-----	-------------

JP 3036032 B2	April 24, 2000	N/A	009	C12M 003/00
---------------	----------------	-----	-----	-------------

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DESCRIPTOR	APPL-NO	APPL-DATE
--------	-----------------	---------	-----------

JP 04126068A	N/A	1990JP-0246638	September 17, 1990
--------------	-----	----------------	--------------------

JP 3036032B2	N/A	1990JP-0246638	September 17, 1990
--------------	-----	----------------	--------------------

JP 3036032B2	Previous Publ.	JP 4126068	N/A
--------------	----------------	------------	-----

INT-CL (IPC): C12M003/00, C12M003/06, C12N005/06, C12N005/08

ABSTRACTED-PUB-NO: JP 04126068A

BASIC-ABSTRACT:

Appts. comprises filter having porous plates to which cells adhere and hollow support shaft on which the porous plates are mounted and closed vessel contg. the filter with the support shaft fixed to the vessel.

USE - For making large amounts of cells to produce interferon.

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/5

DERWENT-CLASS: D16

CPI-CODES: D05-H02;

⑫ 公開特許公報(A)

平4-126068

⑤ Int. Cl.⁵C 12 M 3/00
3/06

識別記号

A

庁内整理番号

9050-4B
9050-4B
7236-4B

④ 公開 平成4年(1992)4月27日

C 12 N 5/00

E※

審査請求 未請求 請求項の数 8 (全7頁)

⑭ 発明の名称 細胞の培養方法及びその装置

⑰ 特 願 平2-246638

⑱ 出 願 平2(1990)9月17日

⑲ 発 明 者 昆 正 浩 東京都千代田区内神田1丁目1番14号 日立プラント建設株式会社内

⑲ 発 明 者 福 島 幸 生 東京都千代田区内神田1丁目1番14号 日立プラント建設株式会社内

⑲ 発 明 者 鈴 木 茂 美 神奈川県茅ヶ崎市本村2丁目8番1号 東陶機器株式会社茅ヶ崎工場内

⑲ 出 願 人 日立プラント建設株式会社 東京都千代田区内神田1丁目1番14号

⑲ 出 願 人 東陶機器株式会社 福岡県北九州市小倉北区中島2丁目1番1号

⑲ 代 理 人 弁理士 松浦 憲三

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

細胞の培養方法及びその装置

2. 特許請求の範囲

(1) 表面に細胞が付着する複数枚の多孔板と、該複数枚の多孔板が所定間隔で並設されるとともに多孔板の表面と連通する貫通孔を有する回転自在な支軸とから成る濾過体と、

前記濾過体を収納するとともに該濾過体の支軸を支持する密閉容器と、

培養液を含む1乃至複数の流体を前記密閉容器に加圧状態で供給する手段と、

を備えたことを特徴とする細胞の培養装置。

(2) 前記濾過体の支軸の貫通孔に、前記多孔板から細胞を剝離させるための流体を加圧状態で供給する手段を備えたことを特徴とする請求項(1)記載の細胞の培養装置。

(3) 濾過体の多孔板を、孔径10 μ m～100 μ mの多孔質の支持体の外周上に、孔径0.01 μ m～

5 μ mの多孔質の層を設けて多層構造としたことを特徴とする請求項(1)又は(2)記載の細胞の培養装置。

(4) 貫通孔を有する支軸に細胞を付着させる複数の多孔板を、支軸内の貫通孔に連通するように装着して成る濾過体を、密閉容器内に設置した培養装置を用い、培養液を加圧状態にして密閉容器に供給すると共に、支軸内の貫通孔を大気圧又は減圧状態にし老廃物を含む培養液を多孔板及び貫通孔を介して取り出すことを特徴とする細胞の培養方法。

(5) 密閉容器内に種細胞懸濁液を供給して多孔板の半分又は全体を種細胞懸濁液中に浸漬した後、密閉容器内を加圧して種細胞懸濁液を多孔板で濾過して多孔板に細胞を付着させることを特徴とする請求項(4)記載の細胞の培養方法。

(6) 密閉容器内に培養液を供給して多孔板の一部を培養液に浸漬し、密閉容器内に圧縮空気を供給して多孔板を酸素を含む無菌の気体に接触させ、多孔板を回転させて細胞に酸素を供給することを

特徴とする請求項(4)又は(5)記載の細胞の培養方法。

(7)新鮮な培養液又は緩衝液を加圧して密閉容器内に供給した後、誘導剤を加圧して密閉容器内に供給し、生産された生産物を含む培養液を多孔板及び貫通孔を介して取り出すことを特徴とする請求項(4)、(5)又は(6)記載の細胞の培養方法。

(8)貫通孔を介して多孔板から剝離用の液体を導出させて多孔板に付着した細胞を多孔板から剝離することを特徴とする請求項(4)、(5)、(6)又は(7)記載の細胞の培養方法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は接着性の細胞を高密度且つ大量に培養する方法及び装置に係り、特に細胞が代謝した老廃物を取り出す濾過設備を備えた細胞の培養方法及びその装置に関する。

〔従来の技術〕

近年、生体外で細胞を大量に培養してインターフェロン等の生物薬品を生産する技術はとみにその重要性を増している。特に接着性の細胞は多く

しかしながら、マイクロキャリア法は攪拌槽内で培養するため、攪拌翼によって物理的な損傷を受けることが避けられず、高密度に培養することが困難であるという問題がある。また、培養開始前にマイクロキャリア上に種細胞を付着させるために、マイクロキャリアを約10時間細胞懸濁液中に浸漬する必要があるため、マイクロキャリアに付着せず懸濁液中に残留する細胞が多く、この間に細胞が死滅するという問題がある。更に、細胞培養中に酸素の供給をするときに、培養液が発泡したり、マイクロキャリアからの細胞の分離が困難であるという問題がある。

一方、ホロファイバー法はホロファイバー内の圧力が高く液供給口付近では容器内との差圧が大きいので膜を介して培養液を容器内に供給し、液出口付近ではホロファイバー内の圧力が容器内より低くなるので膜を介して培養液を取り出している。このため、ホロファイバーの中央付近では、ホロファイバー内と容器の差圧が少ないので膜を透過する培養液の量が少なくなる。従って、培養

の生理活性物質を生産するので、その大量且つ高密度培養技術の確立は生産の効率向上や生産コスト低減のために必須である。

ところで、一般に接着性の細胞を大量で高密度に培養する方法として、マイクロキャリア法とホロファイバー法が知られている。マイクロキャリア法は直径数百 μm のマイクロキャリア上に細胞を付着させ、通気攪拌槽内で浮遊培養する方法であり、この方法はスケールアップが容易で大量培養に適する。

一方、ホロファイバー法はホロファイバー膜を束ねた容器内で細胞を膜に付着させて培養するもので、膜を介して栄養分と酸素を含む新鮮な培養液を細胞に供給でき、部分的には 10^8 個/ cm^2 の高濃度まで細胞を培養することができる(例えば特開昭62-163687号公報参照)。このホロファイバー法は培養液の供給及び取り出しを、ホロファイバー内に培養液を流して供給口と液出口の圧損を利用して行っている。

〔発明が解決しようとする課題〕

液の供給が不均一になるため、部分的にしか高濃度の培養を行えないという問題がある。また、束状のホロファイバー膜から細胞を剝離させることが困難なので、細胞の収率が低くなると共にホロファイバーの再利用が不可能になり、ランニングコストが高価になるという問題がある。

本発明はこのような事情に鑑みて成されたもので、細胞に培養や酸素を均一に供給して、大量の細胞を高密度に培養できる細胞の培養方法及びその装置を提供することを目的とする。

〔課題を解決する為の手段〕

本発明は、前記目的を達成する為に、表面に細胞が付着する複数枚の多孔板と、該複数枚の多孔板が所定間隔で並設されるとともに多孔板の表面と連通する貫通孔を有する回転自在な支軸とから成る濾過体と、前記濾過体を収納するとともに該濾過体の支軸を支持する密閉容器と、培養液を含む1乃至複数の流体を前記密閉容器に加圧状態で供給する手段と、を備えたことを特徴としている。

また、本発明は、前記目的を達成する為に、貫

通孔を有する支軸に細胞を付着させる複数の多孔板を、支軸内の貫通孔に連通するように装着して成る濾過体を、密閉容器内に設置した培養装置を用い、培養液を加圧状態にして密閉容器に供給すると共に、支軸内の貫通孔を大気圧又は減圧状態にし老廃物を含む培養液を多孔板及び貫通孔を介して取り出すことを特徴としている。

〔作用〕

本発明によれば、貫通孔が形成されている支軸に、貫通孔に連通するように濾過体の多孔板を複数板並設して支軸を密閉容器内に設け、更に培養液等を供給する供給手段を密閉容器に連通した。従って、この供給手段を操作すると新鮮な培養液を密閉容器内に供給して濾過体の多孔板に付着した細胞に栄養分と酸素とを与え、同時に細胞に付着している老廃物を除去して培養液と共に多孔板を透過して細胞から分離することができる。

〔実施例〕

以下添付図面に従って本発明に係る細胞の培養方法及びその装置の好ましい実施例を詳説する。

第3図は多孔板20の詳細と、その回転軸14への取付け状態とを示したもので多孔板20はセラミック製の円板で、その内周面は回転軸14の貫通孔16と連通する連通孔18に当接して設けられている。多孔板20は孔径10 μ m~100 μ mと粗く透過抵抗が小さい多孔質の支持体26A上に孔径0.01 μ m~5 μ mと細かく透過抵抗が大きい多孔質の層26Bを設けた多層構造の多孔質層26で形成されている。このため、液が透過するときには多孔板20の表面での圧損が律速となって、多孔板20上のいずれの個所においても貫通孔16まで液が流れるときの圧損がほぼ等しくなる。従って、貫通孔16に近い個所だけから液がショートパスすることがなく、いずれの場所からも均一に培養液の供給及び取り出しが行なえるので、多孔板ユニット13は培養液の供給用及び細胞の老廃物取り出し用の両方に用いることができる。また、多孔板20は細胞の付着を容易にするために、表面の粗さを約20 μ mに研磨している。この多孔板20は、その直径が300mm、

第1図は本発明による培養装置の一実施例を示す全体図である。培養装置10は円筒型の密閉容器12を備え、密閉容器12には多孔板ユニット13が設けられている。この多孔板ユニット13の回転軸14は、第2図に示すように密閉容器12の中心に回転自在に支持され、回転軸14には軸線上に貫通孔16が形成されている。貫通孔16は第2図上で回転軸14の左端部に開口して流入口16Aを形成している。回転軸14にはドーナツ状の多孔板20、20…が装着され、この多孔板20は連通孔18を介して貫通孔16に連通している。

また、密閉容器12には流入口22と流出口24とが設けられている。密閉容器12は内径330mm、長さ700mmの円筒状に形成され、その中に多孔板20、20が設けられているので、密封容器12の有効容積は42ℓである。また、密閉容器12の外周面には温度調節のために外周面に沿って温水を流すことができるようにジャケット25が取付けられている。

厚さが5mmに形成され、密閉容器12の回転軸14に8mm間隔で各々50枚配設されている。

多孔板ユニット13が収納されている密封容器12は第1図に示すように培養液などを貯留する各槽(34、36、38、39、40、42、44、46)、及び送液のための圧力源となるコンプレッサ30、真空ポンプ32等に接続されている。

以下第1図に基づいてこれらの関係を説明する。密封容器12の流入口22には、種細胞貯槽34、洗浄などに使用される緩衝液の貯槽36、多孔板20を洗浄するアルカリ液の貯槽38、及び培養液貯槽39が連通されている。これらの各貯槽34、36、38及び39はコンプレッサ30と接続されており、コンプレッサ30からの無菌圧縮空気て液を加圧し、密閉容器12に送れるようになっている。また、流入口22には滅菌用の蒸気が発生するボイラ40も連通されている。

流出口24には、密閉容器12の液を排出する管33A、及び培養完了後多孔板20から剝離さ

れた細胞を種細胞貯槽34に送るための管33Bが接続されている。

多孔板ユニット13の回転軸14の流出入口16Aには、培養完了後多孔板20から細胞を剝離させるためのトリプシンを供給するためのトリプシン貯槽42が連通されている。このトリプシン貯槽42もコンプレッサ30と接続されており、コンプレッサ30からの無菌圧縮空気で液を加圧し、密閉容器12に送れるようになっている。また、この流出入口16Aには、細胞の生産物を回収する生産物貯槽44、細胞の老廃物を回収する老廃物貯槽46が連通されている。これらの貯槽44、46は真空ポンプ32と接続されており、多孔板20を介して密閉容器12から液を回収できるようにになっている。

尚、第1図上で48は無菌フィルタ、50は培養液供給用及び細胞の老廃物取出し用の切換弁、第2図上で52はジャケット25への温水供給口、54はジャケット25からの温水排出口、56はモータ、58、60はプーリ、62はベルトであ

る。器12内に送り、多孔板20、20…を介して培養液を回転軸14の貫通孔16から取り出すことによって行う。

これにより、細胞は液とともに多孔板20、20…の方向に流されるが、多孔板20、20…を透過することができないので、強制的に多孔板20、20…の表面に付着させられる。通常行われている浸漬のみによる細胞の付着時間が4～14時間を要するのに対し、本願発明のろ過を伴う方法では約3.0分で付着が完了する。このため、細菌汚染の可能性を少なくすることができると共に細胞の付着率及び生存率をほぼ100%にできる。

次いで、栄養分と酸素を含む新鮮な培養液を供給し、老廃物を含む培養液を取り出して多孔板20、20…に付着した細胞を大量に増殖させる。この増殖は、密閉容器12の流入口22から、0.01～1.0 kgf/cm²に加圧した新鮮な培養液を圧入し、貫通孔16を大気圧または-0.05 kgf/cm²程度の減圧状態にして流出入口16Aを経て培養液を取り出すことによって行う。この時、加圧された新鮮

る。

次に、発明の細胞の培養装置による培養の一例として、人胚絨芽細胞によるインターフェロン(IFN)の生産例を示す。

まず、密閉容器12の流入口22から121℃以上の蒸気を密閉容器12内に送り、密閉容器12内を20分間以上121℃に保つことにより空滅菌を行う。次に、操作は温水供給口52から温水を供給して密閉容器12のジャケット25に温水を循環させて密閉容器12を37℃に保存する。

この状態で細胞を多孔板20、20…の表面に付着させる。表面への付着は、コンプレッサ30及び真空ポンプ32を作動して細胞を種細胞貯槽34から密閉容器12内に満たすと共に、濃度10⁵個/mlに懸濁した培養液(仔ウシ血清5%を加えたME S培地)を培養液貯留槽39から密閉容器12内に満たした後、滅菌し溶存酸素を飽和させた緩衝液(PBS液)を0.5 kgf/cm²に加圧して緩衝液貯留槽36から流入口22を介して密閉容

器12内に送り、多孔板20、20…を介して培養液を回転軸14の貫通孔16から取り出すことによって行う。このように老廃物の除去を伴う培養方法で、数日後には多孔板20、20…上に高密度の細胞が付着する。

続いて、供給する培養液中にIFN誘導剤を加え、IFNの生産を開始させる。IFNは、貫通孔16の流出入口16Aから培養液とともに取り出される。

次に、IFNの生産が完了した細胞を多孔板20、20…から剝離して、多孔板20、20…を再使用する。これは、密閉容器12内の培養液を緩衝液と交換した後、貫通孔16を通じてトリプシン液を多孔板20、20…の内面から滲出させて行うことができる。この方法によると、多孔板20、20…に付着している細胞の付着面をトリプシンで直接処理できるので、2分間で剝離が終了する。この時間はトリプシン液中で攪拌するだけの従来の方法の約1/10に相当する。

また、この時モータ 5 6 を駆動して多孔板 2 0、2 0 … を回転すると、さらに短時間で細胞を剝離することができる。剝離された細胞は、密閉容器 1 2 内を緩衝液で洗浄する時緩衝液とともに取り出し、一部は次回の培養の種細胞として利用するため種細胞貯槽 3 4 に貯留する。

細胞の排出後、多孔板 2 0、2 0 … を洗浄するために、密閉容器 1 2 をアルカリ液（界面活性剤を含む 0.5 % の水酸化ナトリウム溶液）で満たし、多孔板 2 0、2 0 … を 1 0 0 r p m で約 1 時間回転させる。この操作によって、多孔板 2 0、2 0 … は、その表面上の付着物や残留物を除去することができるので、繰り返し培養に使用できる。

前記実施例では、培養中の酸素の供給方法として、酸素を含む新鮮な培地を密閉容器 1 2 に供給したが、酸素を大量に要求する細胞の場合には、次の方法で酸素を供給することができる。まず、培養液の量を密閉容器 1 2 の約 1/2 とし、多孔板 2 0、2 0 … の半分が液面からでるようにしてから多孔板 2 0、2 0 … を 3 0 ~ 5 0 r p m で回転さ

せる。この状態で流入口 2 2 から酸素を含む気体（5 % 炭酸ガスと無菌空気など）を送ると、細胞への酸素の供給効率が大幅に向上する。

また、前記実施例では生産物の回収方法として、新鮮な培養液を送って細胞が代謝した生産物を回収したが、培養液に代えて安価な緩衝液を用いてもよい。

更に、前記実施例では、多孔板ユニット 1 3 の回転軸 1 4 が一軸の場合について説明したが、これに限らず、培養容量を大きくする場合には、第 4 図に示すように回転軸を二軸使用して多孔板ユニットを二セット使用してもよい。この場合の細胞の培養装置の全体図を第 5 図に示す。尚、第 5 図上で 6 0 は密閉容器であり、第 4 図、第 5 図において前記実施例と同一部材については同一符号を付して説明を省略する。

第 4 図に示す実施例では、二セットの多孔板ユニットの多孔板を隣接していないで設けたが、二セットの多孔板同士がかみ合うように設けてもよい。尚、多孔板ユニットは二セットに限らず複数

セット設けてもよい。

〔発明の効果〕

本発明に係る培養方法及びその装置によれば、の濾過体の多孔板の全域で細胞と培養液を均一に分離できるので、多孔板に付着した細胞に培養液に含まれている栄養分及び酸素を均一に供給することができる。従って、大量の細胞を高密度に培養できるので効率のよい生産を行うことができる。

また、細胞懸濁液を濾過することによって、培養開始前に濾過体の多孔板に細胞を短時間でかつ確実に付着させられることができる。

更に、培養終了後に容易に細胞を濾過体の多孔板から剝離させることができるので多孔板の再生が可能である。

また、濾過体の多孔板を孔径の大きな多孔質の支持体の外周上に孔径の小さな多孔質の層を設けた多層構造にすることによって、多孔板の表面のいずれの場所からも均一に培養液の供給及び取り出して行うことができ、更に、細胞を容易に付着することができる。

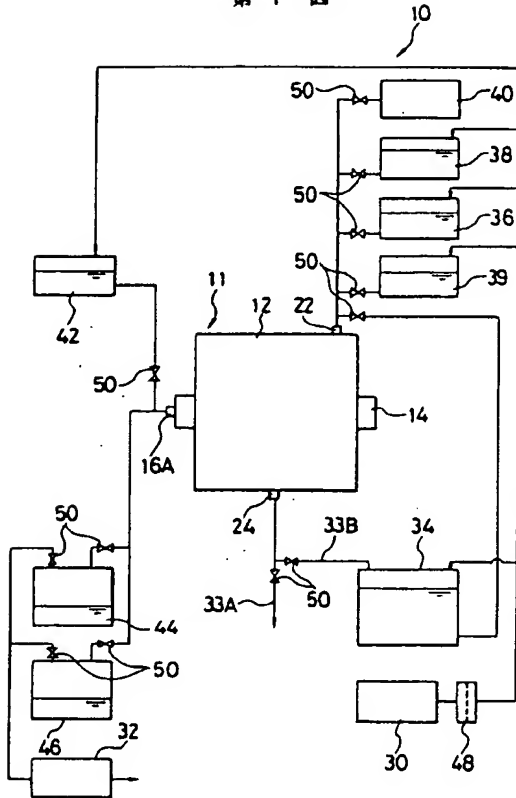
4. 図面の簡単な説明

第 1 図は本発明に係る細胞の培養装置を示す全体図、第 2 図は多孔板ユニットの構造を示す断面図、第 3 図は多孔板の拡大図、第 4 図は本発明に係る細胞の培養装置の他の実施例に使用される多孔板ユニットの断面図、第 5 図は第 4 図の多孔板ユニットが使用された細胞の培養装置。

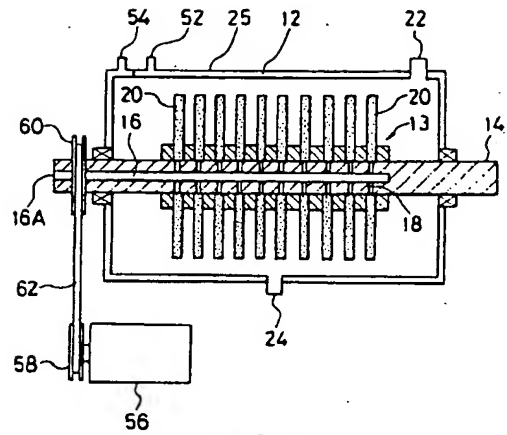
1 0 … 細胞の培養装置、 1 2、6 0 … 密閉容器、
1 4 … 回転軸、 1 6 … 貫通孔、
2 2 … 流入口、 3 0 … 圧縮器、
3 2 … 真空ポンプ、 3 4 … 種細胞貯送、
3 9 … 培養液貯槽。

代理人 弁理士 松浦憲三

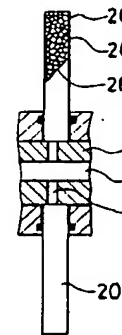
第 1 図



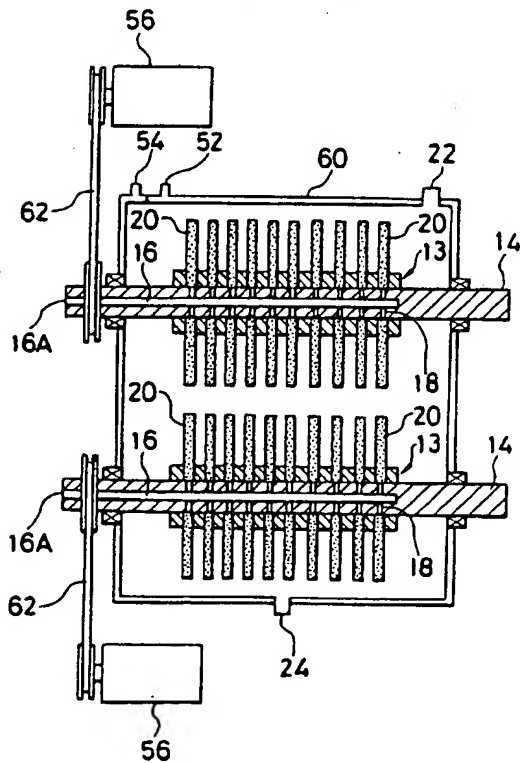
第 2 図



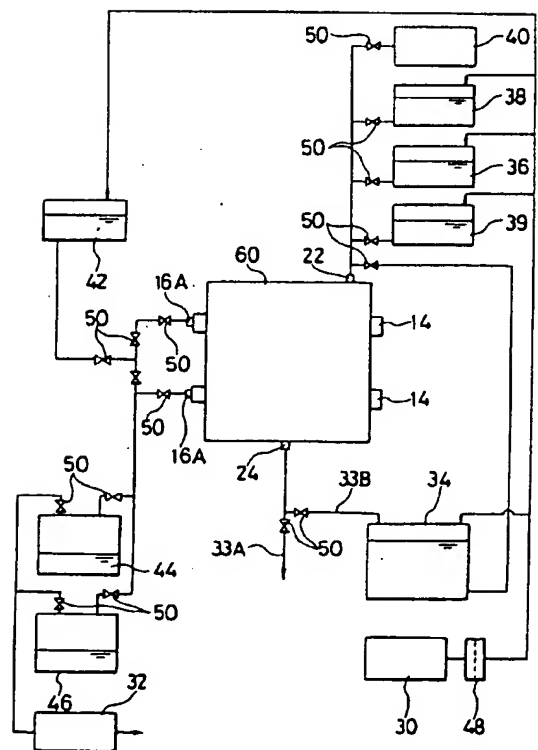
第 3 図



第 4 図



第 5 図



第 1 頁の続き

⑤Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

C 12 N 5/06
5/08

⑦発 明 者	山 野 繁	神奈川県茅ヶ崎市本村 2 丁目 8 番 1 号 東陶機器株式会社 茅ヶ崎工場内
⑦発 明 者	前 橋 信 之	神奈川県茅ヶ崎市本村 2 丁目 8 番 1 号 東陶機器株式会社 茅ヶ崎工場内